

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293231

研究課題名(和文)人工ヌクレアーゼによる食細胞異常症由来ヒトiPS細胞の遺伝子修復に関する研究

研究課題名(英文) Gene editing of iPS cells derived from patients with congenital phagocytic disorders

研究代表者

小林 正夫 (Kobayashi, Masao)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：00162016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：先天性好中球減少症(SCN)患者(ELANE変異)の骨髄細胞から作製、樹立した疾患特異的iPS細胞を造血系、骨髄顆粒球系細胞に分化し、患者骨髄の病態とほぼ同じ成熟障害を認めたことから、iPS細胞は患者病態を反映することが明らかとなった。TALENを用いた遺伝子編集技術から患者で認められた遺伝子修復を試み、そのiPS細胞を骨髄顆粒球系細胞に分化すると患者で認められていた成熟障害が修復されていたことから、遺伝子編集の効果が明らかとなった。以上の結果から、疾患特異的iPS細胞は病態解析に有用であることと、遺伝子編集技術で病態修復の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated the establishment of the disease-specific iPS cells from patients with severe congenital neutropenia (SCN). Differentiation of myeloid cells derived from SCN-iPS cells was defected at the level of promyelocyte and myelocyte. This defect observed in iPS cells was similar finding shown in bone marrow of SCN patients. The mutation of ELANE identified in an SCN patient were corrected by gene-editing method using TALEN. The iPS cells edited were completely differentiated to mature neutrophils, suggesting the restoration of neutropenia in SCN patients. These results suggest that disease-specific iPS cells from patients with SCN may be useful to analyze the pathogenesis of the defect of myeloid differentiation, and that the possible restoration of ELANE mutation by gene-editing method using TALEN may result in the normal myeloid differentiation of neutrophils in iPS cells.

研究分野：小児科学，血液学，免疫学

キーワード：先天性好中球減少症 iPS細胞 遺伝子編集 人工ヌクレアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

これまで種々の原発性食細胞異常症の診断(責任遺伝子の同定),病態解析を行ってきた。特に先天性好中球減少症ではモデルマウスの作製が困難なことから,免疫不全マウスにヒト疾患細胞を異種間移植したヒト化マウスを作製し,その病態解析を継続している。また,先天性好中球減少症患者の骨髓細胞から疾患特異的 iPS 細胞を作製することに成功し,好中球系分化誘導のもとに病態解析への応用を開始している。最近,他の食細胞異常症からの疾患特異的 iPS も樹立している。

## 2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞と疾患特異的 iPS 細胞の維持と造血系への分化誘導 免疫不全マウスへの iPS 細胞の異種間移植とヒト化マウスの作成 人工ヌクレアーゼ作製とその作用の検証ならびに正常遺伝子挿入の3点を遂行し,人工ヌクレアーゼ(人工制限酵素)による遺伝子編集技術を iPS 細胞に応用して, iPS 細胞での病態発現と患者由来の iPS 細胞での遺伝子修復の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

- ・ヒト由来 iPS 細胞と先天性好中球減少症(SCN)患者由来 iPS 細胞を用いて,造血系特に骨髓顆粒球系への分化を in vitro で誘導する。
- ・人工的に transcription activator-like effector nucleases (TALENs) を作製し, iPS 細胞への遺伝子編集を行う。iPS 細胞のアデノ関連ウイルス1部位である特定領域切断出来る制限酵素のデザインを行い, homologous recombination を利用して遺伝子切断部位に好中球エラストラーゼの正常遺伝子(ELANE)を挿入。
- ・遺伝子修復された患者由来 iPS 細胞が長期間,正常遺伝子として,機能しているかどうかの確認。

## 4. 研究成果

先天性好中球減少症(SCN)患者(ELANE変異)の骨髓細胞から作製,樹立した疾患特異的 iPS 細胞を造血系,骨髓顆粒球系細胞に分化し,患者骨髓の病態とほぼ同じ成熟障害を認めたことから, iPS 細胞は患者病態を反映することが明らかとなった。TALEN を用いた遺伝子編集技術から患者で認められた遺伝子修復を試み,その iPS 細胞を骨髓顆粒球系細胞に分化すると患者で認められていた成熟障害が修復されていたことから,遺伝子編集の効果が明らかとなった。また正常人由来 iPS 細胞に TALEN を用いた遺伝子編集から患

者で認められた遺伝子変異を導入し,患者とほぼ同じ成熟障害が認められた。以上の結果から,疾患特異的 iPS 細胞は病態解析に有用であることと,遺伝子編集技術で病態修復の可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 35 件)

1. Hayakawa S, Okada S, Tsumura M, Sakata S, Ueno Y, Imai K, Morio T, Ohara O, Chayama K, Kobayashi M: A patient with CTLA-4 haploinsufficiency presenting gastric cancer. *Journal of Clinical Immunology* 36: 28-32, 2016. (査読有り)

2. Okada S, Markle JG, Deenick EK, Mele F, Averbuch D, Lagos M, Alzahrani M, Al-Muhsen S, Halwani R, Ma CS, Wong N, Soudais C, Henderson LA, Marzouqa H, Shamma J, Gonzalez M, Martinez-Barricarte R, Okada C, Avery DT, Latorre D, Deswarte C, Jabot-Hanin F, Torrado E, Fountain J, Belkadi A, Itan Y, Boisson B, Migaud M, Arlehamn CS, Sette A, Breton S, McCluskey J, Rossjohn J, de Villartay JP, Moshous D, Hambleton S, Latour S, Arkwright PD, Picard C, Lantz O, Engelhard D, Kobayashi M, Abel L, Cooper AM, Notarangelo LD, Boisson-Dupuis S, Puel A, Sallusto F, Bustamante J, Tangye SG, Casanova JL: Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science* 349: 606-13, 2015. (査読有り)

3. Wilson RP, Ives ML, Rao G, Lau A, Payne K, Kobayashi M, Arkwright PD, Peake J, Wong M, Adelstein S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Picard C, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Gray P, Stepensky P, Warnatz K, Freeman AF, Rossjohn J, McCluskey J, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Ma CS, Tangye SG, Deenick EK: STAT3 is a critical cell intrinsic regulator of human unconventional T cell numbers and function. *Journal of Experimental Medicine* 212: 855-64, 2015. (査読有り)

4. Ma, CS, Wong N, Rao G, Avery DT, Torpy J, Hambridge T, Bustamate J, Okada S, Stoddard JL, Deenick EK, Pelham SJ, Payne K, Boisson-Dupuis S, Puel A, Kobayashi M, Arkwright PD, Kilic SS, Baghdadi JE,

Nonoyama S, Minegishi Y, Mahdviani SA, Mansouri D, Bousfiha A, Blincoe AK, French MA, Hsu P, Campbell DE, Stormon MO, Wong M, Adelstein S, Smart JM, Fulcher DA, Cook MC, Phan TG, Stepensky P, Boztug K, Ikinogullari A, Baumann U, Beier R, Roscioli T, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Tangye S: Monogenic mutations differentially impact the quantity and quality of T follicular helper cells in human primary immunodeficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136: 993-1006, 2015. (査読有り)

5. Hirata O, Okada S, Tsumura M, Karakawa S, Matsumura I, Kimura Y, Maihara T, Yasunaga S, Takihara Y, Ohara O, Kobayashi M: Mosaicism of an ELANE mutation in an asymptomatic mother in a familial case of cyclic neutropenia. *Journal of Clinical Immunology* 35: 512-6, 2015. (査読有り)

6. Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica* 99: 19-27, 2014. (査読有り)

7. Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M: Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of Leukocyte Biology* 95: 667-676, 2014. (査読有り)

他 28 件

[学会発表](計 40 件)

1. Nishimura S, Tsumura M, Hirata O, Reiko Kagawa, Mizoguchi Y, Okada S, Kobayashi M: MSMD Patients with IFN- $\gamma$ -STAT1 Signaling Defect Present Enhanced Osteoclastogenesis and Bone Resorption. The 57<sup>th</sup> American Society of Hematology

Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, USA, Dec 5-8. 2015.

2. Saito S, Nishimura S, Tsumura M, Mizoguchi Y, Sakata S, Furue A, Kobayashi M: A comparison of myelopoiesis from induced pluripotent stem cells with a mutation in *ELANE* between cyclic neutropenia and severe congenital neutropenia. The 57<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, USA, Dec 5-8. 2015.

3. Okada S, Markle J, Kobayashi M, Bustamante J, Casanova JL: Impairment of IL-17 immunity to *Candida* and IFN immunity to *Mycobacterium* in humans with bi-allelic *Rorc* mutations. The 57<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, USA, Dec 5-8. 2015.

4. Akari N, Utsunomiya, Miyuki Tsumura, Norioki Ohno, Mizuka Miki, Hiroshi Kawaguchi, Kazuhiro Nakamura and Masao Kobayashi: Excessive Nitric Oxide production of CGD neutrophils induces the down-regulation of *NOS3* and *EDN1* expression in human endothelial cells. The 56<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, USA, Dec 6 - 9, 2014

5. Yoko Mizoguchi, Satoshi Okada, Miyuki Tsumura, Osamu Hirata, Shizuko Minegishi, Jean-Laurent Casanova, Tomohiro Morio, Masao Kobayashi: *STAT1* gain-of-function in patients with chronic mucocutaneous candidiasis can be detected by the excessive phosphorylation of STAT1 in peripheral blood monocytes. The 56<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, USA, Dec 6 - 9, 2014

6. Seiich Hayakawa, Seiko Maeno, Norioki Ohno, Satoshi Okada, Yutaka Nishimura, Michiko Hayashidani, Masao Kobayashi: Significant augmentation of regulatory T cells in early neonatal period. 16<sup>th</sup> Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Prague, Czech, Oct 29 to Nov 1, 2014.

7. Yoko Mizoguchi, Aya Furue, Ikue Chijimatsu, Mizuka Miki, Keita Tomioka,

Nakao Konishi, Atsushi Ono, Hiroshi Kawaguchi, Kazuhiro Nakamura and Masao Kobayashi: Early elimination of Factor VIII inhibitor by ITI with high dose immunoglobulin in hemophilia A children. WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2014 World Congress, Melbourne, Australia, May 11-15, 2014.

他 33 件

〔図書〕(計 2 件)

1. 小林正夫 血球の形態・機能 白血球 (pp.18-20), 白血球の異常 好中球減少症 (pp. 395-399) 小児血液・腫瘍学 日本小児血液・がん学会編集 2015 年 10 月 診断と治療社

2. 小林正夫 白血球機能異常症 (pp. 403-406) 原発性(先天性)免疫不全症(pp. 417-420) カラーテキスト 血液病学 第 2 版 木崎昌弘 編著 中外医学社 2013 年 12 月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 正夫 (Kobayashi Masao)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号：00162016

(2)研究分担者

津村 弥来 (Tsumura Miyuki)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・研究員  
研究者番号：80646274

岡田 賢 (Okada Satoshi)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・講師  
研究者番号：80457241 (平成 26 年度～)

山本 卓 (Yamamoto Takashi)  
広島大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：90244102

中村 和洋 (Nakamura Kazuhiro)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授  
研究者番号：70363059 (平成 25 年度のみ)

(3)連携研究者

( )

研究者番号：